Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Graumann

Funktionsentwicklung der Nebenniere beim Goldhamster

Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen an der Rinde

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Joachim Becker
aus Schönaich

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0131

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. W. Graumann

Funktionsentwicklung der Nebenniere beim Goldhamster

Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen an der Rinde

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hans-Joachim Becker
aus Schönaich

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. med. J. Peiffer

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. M. Arnold
(Professor Dr. med. W. Graumann)

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H.J. Mallach

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG • Tübingen

I N H A L T S V E R Z E I C H I S

	Seite
Einleitung	3
Material und Methoden	4
1) Lichtmikroskopische Untersuchungen	4
2) Elektronenmikroskopisch-morphologische Untersuchungen	5
3) Elektronenmikroskopisch-histochemische Untersuchungen	6
4) Anmerkung	6
Ergebnisse	8
1)Lichtmikroskopische Befunde	8
2) Elektronenmikrosiopisch-morphologische Befunde	11
3) Elektronenmikroskopisch-histochemische Befunde	12
Diskussion	13
Zusammenfassung	23
Literaturverzeichnis	24
Abbildungslegenden	35
Abbildungen	39

EINLEITUNG

Im Verlauf einer Untersuchung der Funktionsentwicklung des Nebennierenmarkes fiel auf, daß die Mitochondrien der embryonalen Nebennierenrinde zunächst dem Crista-Typ angehören und erst während der letzten fetalen Tage anstelle der Cristae Tubuli entwickeln (ARNOLD und HAGER, 1967). Es wurde vermutet, daß es sich bei diesem Umbauprozess um den morphologischen Ausdruck eines den Steroidhaushalt betreffenden Funktionswandels handelt.

Die Steroidsynthese könnte an Mitochondrien vom Tubulus-Typ gebunden sein. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Aktivitätsentwicklung der d5-3ß-Hydroxysteroiddehydrogenase (3ß-HSD; E 24.3.46) in der Nebennierenrinde und die Mitochondrienstruktur in der Ontogenese untersucht. Von besonderer Bedeutung erschien dabei, ob sich ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Entwicklung der 3ß-HSD-Aktivität und dem Umbau der Mitochondrienstruktur nachweisen lasse oder nicht. Die Beantwortung dieser Frage mußte in hohem Maße von der Empfindlichkeit der verwendeten Nachweismethode abhängen. Die Erfassbarkeit wird bei histochemischen Untersuchungen allgemein umso besser, je größer das Auflösungsvermögen des optischen Systems ist (ARNOLD, 1967). Es wurde daher trotz der zu erwartenden Schwierigkeiten versucht, das Enzym mit einer elektronenmikroskopisch-histochemischen Methode nachzuweisen.

MATERIAL UND METHODE

Die Untersuchungen wurden an Goldhamstern (Mesocricetus auratus WATERHOUSE) aus institutseigener Zucht durchgeführt. Es kamen drei praenatale und neun postnatale Stadien zur Untersuchung.

Zur Altersbestimmung der praenatalen Stadien wurde von dem nach beobachteter Copulation in Frage kommenden Ovulationstermin ausgegangen und Feten der Altersstufen -3, -2, -1 Tage vor der Geburt, das entspricht dem 13., 14. und 15. Tag der Embryonalentwicklung, verwandt. Zur Gewinnung der Feten wurden die Muttertiere durch Leuchtgasinhalation getötet und die Feten aus dem Uterus entnommen.

Das Alter der postnatalen Stadien wurde vom Vormittag des Geburtstages an gerechnet. Verwendet wurden hier die Stadien +1 (Neugeborene), +2, +3, +4, +5, +6, +9, +13 und +16, sowie erwachsene Tiere. Die Tiere wurden bis zum Stadium +9 einschließlich durch Decapitation, ältere Tiere durch Leuchtgasinhalation getötet.

1) Lichtmikroskopische Untersuchungen

Feten und Jungtiere wurden sofort nach der Tötung mit aufgeschnittenem Abdomen 24 Std. in 4% Hydroxyadipindialdehyd in 0,05 M Cacodylatpuffer (nach PLUMEL) p_H 7,2 mit 0,44 M Saccharose bei ca. +4 °C fixiert. Vom Stadium +9 Tage an aufwärts wurden die Nieren mit anhaftender Nebenniere herauspräpariert und dann je nach Größe 2 bis 6 Std. fixiert. Anschließend wurden die Präparate in Puffer mit 0,44 M Saccharose mindestens 24 Std. bis höchstens 5 Tage bei +4 °C gespült.

Bis einschließlich zum 6. postnatalen Tag wurden im Kryotom (Fa. WKF) Längsschnitte des ganzen Tieres in der Sagittalebene von 24 µm Dicke angefertigt. Bei älteren Tieren wurden die Nieren mit den Nebennieren aufgefroren und geschnitten und zur Lokalisation der Nebenniere in Abständen von 1 mm jeweils ein Schnitt mit Haemalaun/Erythrosin (ROMEIS 1968, § 703) gefärbt. Vom Anschnitt der Nebenniere an wurden Serienschnitte ausgeführt und auf Deckgläser aufgezogen. Davon wurden je 2 Schnitte pro Stadium zur morphologischen Kontrolle mit Haemalaun/Erythrosin gefärbt, die übrigen gelangten zur Inkubation.

Inkubiert wurde 30 Min. bei +37 - 39°C. Zusammensetzung der Inkubationslösung (modifiziert nach PEARSE 1961):

Saccharose	1,5 g (0,44M)
Na - Azid	6,5 mg
N - Aethylmaleinimid	6,0 mg(0,01M)
Nicotinadenindinucleotid (NAD)	20,0 mg
Steroidsubstrat +	0,3 mg
Nitro - BT++	5,0 mg
Phosphatpuffer nach SØRENSEN 1/15M p_H7,2	9,0 ml

Das Steroidsubstrat wurde in 1ml N,N - Dimethylformamid gelöst und diese Lösung zu der Inkubationslösung gegeben. Inkubiert wurde mit Dehydroepiandrosteron (DHA)+ oder Pregnenolon als Substraten, daneben im Kontrollversuch mit vollständiger Inkubationslösung aber ohne Steroidsubstrat. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 10 Min. in Aqua dest. gespült und 1 Min. mit Kernechtrot (ROMEIS, 1968, §737) schwach gefärbt, zur Ermöglichung einer besseren Orientierung. Nach kurzer Wässerung erfolgte der Einschluß in Glycerin-gelatine.

2) Elektronenmikroskopisch-morphologische Untersuchungen

Zur elektronenmikroskopisch-morphologischen Darstellung der Nebennierenrinde wurden die herauspräparierten Nebennieren 3 Std. in 1% $OsO_4 p_H$ 7,2 (PALADE, 1952) bei ca. 0°C in toto fixiert, in einer austeigenden Acetonreihe entwässert und in Vestopal W (RYTER, KELLENBERGER und SCHWAB, 1956) eingebettet. Auf dem Reichert Mikrotom Typ Om U2 wurden Stufendünnschnitte der Rinde angefertigt. Die mit Bleihydroxid (KARNOVSKY, 1961) kontrastierten Schnitte wurden mit dem Zeiss - Elektronenmikroskop EM 9 untersucht und photographiert.

+Die Substrate wurden von der Firma Schering AG, Berlin zur Verfügung gestellt. Dafür sei an dieser Stelle gedankt.

++Nitro-BT p.A. MG=817,7, Serva-Entwicklungslabor,Heidelberg.

3) Elektronenmikroskopisch-histochemische Untersuchung

Zur elektronenmikroskopisch-histochemischen Darstellung der 3ß-HSD wurde das Material wie bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen fixiert und gewässert. Dann wurden die Nebennieren freipräpariert und in toto in der angegebenen Inkubationslösung,die nun statt Nitro-BT Thiocarbamyl-Nitro-BT+ 0,4 mg/ml als Wasserstoffacceptor enthielt (mit DHA bzw. Pregnenolon als Substrat, sowie einer Kontrolle ohne Substrat) für 30 Min. bei 37 - 39°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Nachfixierung in 1% OsO_4 p_H 7,2 (PALADE 1952) bei 0°C für 3 Std., Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe und Einbettung in Vestopal W. Die Dünnschnitte wurden hier durch die ganze Rinde gelegt und erfaßten noch einen Teil des angrenzenden Markes. Kontrastiert wurde ebenfalls mit Bleihydroxid.

4) Anmerkung

Zur Ermittlung des optimalen Fixierungsmittels wurden lichtmikroskopische Vorversuche mit Succinatdehydrogenase (SDH) angestellt. Die SDH wurde herangezogen, weil sie dank ihrer in den meisten Geweben starken Aktivität eine Aktivitätsminderung durch die Fixierung leichter beurteilen läßt, ihr Nachweis einfacher zu handhaben ist und weil alle Dehydrogenasen sich gegenüber Fixierungen gleich verhalten sollen, was auch im Parallelversuch mit 3ß-HSD bestätigt werden konnte. Unter den geprüften Fixierungsmitteln erwies sich Hydroxyadipinaldehyd, der auch von anderen Untersuchern zur Vorfixierung beim elektronenmikroskopischen 3ß-HSD-Nachweis verwandt wurde (BRADBURY und STEWARD, 1964)als optimal. Die Minderung der Enzymaktivität durch diesen Aldehyd war bei den verwendeten Fixierungszeiten gering. Als unbedingt erforderlich erwies sich aber ein gründliches Auswaschen des Aldehyds, da er die sehr reduktionsempfindlichen Tetrazoliumsalze reduzieren und somit eine unspezifisch positive Reaktion her-

---

+Dargestellt von Prof. Dr. SCHNEIDER, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen nach SELIGMAN et al. (1966).

vorrufen kann. Die Haltbarkeit des fixierten Gewebes in leicht hypertonischer Pufferlösung sowohl was Struktur als auch Enzymaktivität anging, war befriedigend, wenn auch die Wässerung nicht auf Wochen und Monate wie angegeben, sondern höchstens auf 8 bis 10 Tage ausgedehnt werden konnte (SABATINI und BARRNETT, 1963).

Tab. 1:

Enzymerhaltung bei Fixierung von 24 /um dicken Kryostatschnitten, SDH-Nachweis.

Zeit	0'	2'	5'	10'
Formol 4%	++++	⊖	⊖	⊖
Glutardialdehyd 4%	++++	(+)	(+)	(+)
Hydroxyadipin-aldehyd 4%	++++	++++	++++	+++

Tab. 2:

Enzymerhaltung bei Fixierung in toto, 3ß-HSD-Nachweis.

Zeit	0h	1h	2h	5h
Hydroxyadipinaldehyd 4%	++++	++++	+++	+
Crotonaldehyd 4%	++++	(+)	⊖	⊖
Glyoxal 4%	++++	++	+	⊖

E R G E B N I S S E

1) Lichtmikroskopische Befunde

Im Stadium -3 Tage (Abb. 1) ist das Cytoplasma der Rindenzellen stärker eosinophil als das der Markzellen. Eine Rinden-Mark-Grenze ist nicht zu erkennen; es finden sich sowohl Rindenzellen im Marklager, als auch Markzellen im Rindenbereich. Unabhängig vom verwendeten Substrat konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Im Stadium -2 Tage (Abb. 2) ist keine Zonierung der Rinde zu erkennen; morphologisch bestehen also die gleichen Verhältnisse wie im Stadium -3 Tage. Erstmals tritt eine 3ß-HSD-Aktivität auf, wie sich im ganzen Rindenbereich an der Bildung kleiner Formazankristalle in den Zellen zeigt. Die reaktiven Zellen machen etwa die Hälfte der Rindenzellen aus und sind in Zellnestern über das ganze Rindengebiet verstreut.

Im Stadium -1 Tag (Abb. 3) ist die Rinde ca.12 Zellagen breit und nicht zoniert. Eine stark verzahnte Rinden-Mark-Grenze ist angedeutet. Die Formazanbildung ist deutlich höher als im Stadium -2 Tage und in fast allen Rindenzellen zu finden.

Im Stadium +1 Tag (Abb. 4 und 5)(Neugeborenes) liegen unmittelbar unter der Kapsel 3 Lagen Zellen, die kleiner sind als die übrigen Rindenzellen. Eine Zona fasciculata ist angedeutet, die Rinden-Mark-Grenze ist unscharf. Die Formazanablagerung findet sich in allen Rindenzellen.

Im Stadium +2 Tage ist die Rindenbreite auf ca.15 Zellagen angestiegen, die morphologischen Verhältnisse und der Reaktionsausfall entsprechen denen vom Neugeborenenstadium.

Im Stadium +3 Tage ist eine deutliche Rinden-Mark-Grenze vorhanden. Die äußeren und inneren Rindenzonen zeigen gegenüber der mittleren Rindenschicht eine geringere Enzymaktivität als am 2. Tag.

Im Stadium +4 Tage ist die Zonierung deutlicher geworden, im übrigen finden sich die gleichen Verhältnisse wie am 3. Tag.

Im Stadium +5 Tage beträgt die Rindenbreite etwa 15 Zellagen bei deutlicher Rinden-Mark-Grenze. Die kleinzellige subcapsuläre Außenschicht ist stark verschmälert, die Zona glomerulosa und Zona fasciculata sind angedeutet. Die Enzymaktivität ist in den mittleren und inneren Rindenpartien am stärksten.

Im Stadium +6 Tage (Abb. 6) ist die Rinde ca. 20 Zellagen breit mit schmaler Zona glomerulosa, breiter Zona fasciculata und schmaler Zona reticularis. Die Enzymaktivität ist am stärksten in der inneren Zona fasciculata und in der Zona reticularis.

Im Stadium +9 Tage (Abb. 7) tritt zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata eine deutliche, 2-3 Zellagen breite kleinzellige Zone auf, die Zona glomerulosa ist verbreitert auf ca. 3 Zellagen. Diese und die kleinzellige Zone zeigen bei gleichmäßig starker Reaktion in den anderen Rindenteilen eine deutlich schwächere Enzymaktivität.

Im Stadium +13 Tage (Abb. 8) beträgt die Rindenbreite 20-25 Zellagen, die kleinzellige Zone zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata ist schmäler geworden, die Zonen sind im übrigen ebenso entwickelt wie am 9. Tag. Die Enzymaktivität ist in der Zona glomerulosa und der äußersten Zona fasciculata schwach, im übrigen Rindenbereich stark.

Im Stadium +16 Tage (Abb. 9 und 10) ist die Rinde etwa 25 Zellagen breit, wovon auf die Zona glomerulosa etwa 3-5, auf die Zona fasciculata 15 und die Zona reticularis 5 Lagen entfallen. Die kleinzellige Zone ist verschwunden, der Rindenaufbau und die Verteilung sowie die Aktivität der 3ß-HSD entsprechen dem Erwachsenenzustand (Abb. 11 und 12). Die Enzymaktivität ist in allen Zonen gleichmäßig verteilt und stark.

Die Kontrollpräparate zeigen in allen Stadien keine Reaktion. Ein Aktivitätsunterschied bei der Verwendung von DHA oder von Pregnenolon als Substrat war bei keinem der Versuche zu beobachten.

Tab. 3:
Aktivität der 3ß-HSD in der Nebennierenrinde vom Stadium -3 bis +16.

Stadium (Tage)	-3	-2	-1	+1	+2	+3
Aktivität der 3β-HSD	⊖	+	++	+++	+++	+++
Stadium (Tage)	+4	+5	+6	+9	+13	+16
Aktivität der 3β-HSD	+++	+++	+++	++++	++++	++++

2) Elektronenmikroskopisch-morphologische Befunde

Im Stadium -3 Tage (Abb. 13) zeigen alle Rindenzellen kreisrunde bis ovale Mitochondrien, die in den mittleren und inneren Rindenschichten eine geringe Polymorphie aufweisen. Sie sind hier meist in der Mitte leicht verschmälert und gekrümmt. Die Innenstruktur ist vom Crista-Typ mit regelmäßigen, leitersprossenartig angeordneten Cristae und breiten Zwischenräumen.

Bis zum Stadium -1 Tag (Abb. 14) bleiben diese Verhältnisse im wesentlichen gleich. Lediglich in der mittleren Rindenzone zeigen sich nun langgestreckte Mitochondrien, die oft stark gekrümmt sind (Hufeisenformen) und zum Teil um andere Mitochondrien herumgeschlungen erscheinen. In diesem Stadium treten in den Mitochondrien auch erstmals neben den Cristae Tubulus-artige Innenstrukturen auf.

Im Stadium +1 Tag (Abb. 15) zeigen die Mitochondrien der äußersten Zellschichten noch den gleichen Aufbau wie in den vorgeburtlichen Stadien. Markwärts fortschreitend werden ihre Cristae zahlreicher, plumper und kürzer, die Zwischenräume treten dagegen zurück, und es erscheinen zunehmend Tubuli. In allen Rindenzonen sind die Tubuli vorwiegend in den breiteren Anteilen der Mitochondrien anzutreffen, wo sie mitunter außergewöhnlich regelmäßig angeordnet sind. In schmalen,langgestreckten Mitochondrienteilen verschwinden die längs verlaufenden Cristae nie völlig. Die Mitochondrienform ändert sich markwärts von rund und langoval zu lang. Sie sind dort in der Mitte zu extrem dünnen, in den mittleren Rindenzonen oft grotesk um andere Mitochondrien oder Cytoplasmastrukturen herumgeschlungenen Gebilden ausgezogen. An der Rinden-Mark-Grenze ist diese extreme Polymorphie nicht so ausgeprägt vorhanden wie in der Rindenmitte.

In den folgenden Stadien +2 (Abb. 16), +3, +6, +8 (Abb. 17), +10 und +16 Tage ändern sich Struktur und Form der Mitochondrien sowie die Verteilung der beiden Typen auf die Rindenschichten nur unwesentlich. Bemerkenswert ist lediglich eine weitere Zunahme der Polymorphie der Mitochondrien in den mittleren Rindenschichten. Hier nimmt auch die Zahl der Mitochondrien zu. Sie gehören fast ausschließlich dem Tubulustyp an. Die äußersten Zellschichten behalten Crista-Mitochondrien. In den Außenzonen treten am 8. Tag zudem einzelne Mitochondrien mit dicht parallel gelagerten, oft halbkreisförmig gebogenen Cristae auf.

Im Erwachsenenstadium sind in der Zona glomerulosa neben wenigen Mitochondrien vom Tubulus-Typ noch zahlreiche Crista-Mitochondrien zu finden (Abb.18). Dazu kommen in geringer Zahl Mitochondrien mit dicht parallel gelagerten, mitunter mehr oder weniger gebogenen Cristae, die auch einige Tubuli enthalten können. Die Mitochondrien der übrigen Rindenzonen sind durchweg vom Tubulus-Typ und gleichen denen, die schon im Stadium +1 Tag sichtbar werden, völlig (Abb. 19).

3) Elektronenmikroskopisch-histochemische Befunde

Beim 3ß-HSD-Nachweis treten Formazanablagerungen in den Mitochondrien auf, die zwischen den Tubuli und Cristae lokalisiert sind. Hierdurch kommt es zu einer Kontrasterhöhung der Mitochondrien, die sich deutlich von der durch Bleihydroxid herbeigeführten allgemeinen Kontrastierung der übrigen Zellbestandteile unterscheidet (Abb. 21-23.) Die Mitochondrien aus Kontrollpräparaten sind deutlich kontrastärmer (Abb. 20).

D I S K U S S I O N

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Versuch unternommen, die Funktionsentwicklung der Nebennierenrinde elektronenmikroskopisch-histochemisch zu verfolgen.

Die Untersuchung einer Funktionsentwicklung mit elektronenmikroskopisch-histochemischen Verfahren hat beträchtliche Vorteile gegenüber der Untersuchung mit lichtmikroskopisch-histochemischen Methoden:

1) Die Erfassungsgrenze histochemischer Reaktionsprodukte im Elektronenmikroskop ist niedriger als im Lichtmikroskop.

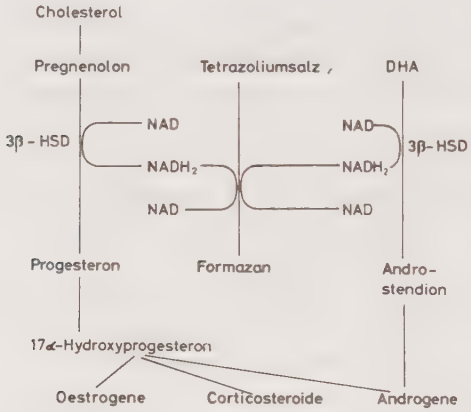
2) Es besteht die Möglichkeit, die Funktionsentwicklung in der einzelnen Zelle selbst zu untersuchen.

3) Die Lokalisationsmöglichkeit histochemischer Reaktionsprodukte in der Zelle ist besser.

Für elektronenmikroskopisch-histochemische Nachweise stehen bislang nur wenige Methoden zur Verfügung. Für die Verfolgung der Nebennierenrindenentwicklung im Sinne einer spezifischen Analyse (ARNOLD, 1966) kommt nur der 3ß-HSD-Nachweis in Frage.

Dieses Enzym nimmt eine Schlüsselstellung in der Corticoidsynthese ein: Es katalysiert die Dehydrierung vom Pregnenolon zum Progesteron. Von hier aus ist dann die weitere Biosynthese außer zu den Corticosteroiden auch zu den Progesteronderivaten, den Androgenen und Oestrogenen möglich. Diese zentrale Stellung im Steroidstoffwechsel macht es verständlich, daß in der Ontogenese die 3ß-HSD- und die 16ß-HSD nicht nur in der Nebennierenrinde, sondern gleichzeitig auch in den Gonaden auftritt (HART, CALMAN und FERGUSON 1966). Die beiden in der vorliegenden Unter-

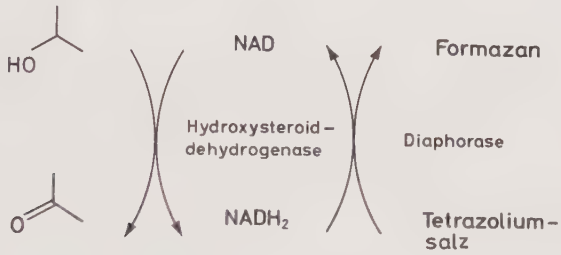
suchung verwendeten Substrate, DHA und Pregnenolon werden in folgenden Reaktionen metabolisiert:



Der lichtmikroskopische 3ß-HSD-Nachweis ist schon seit einem Jahrzehnt bekannt und an verschiedenen Organen durchgeführt worden. Die dazu entwickelten Methoden unterscheiden sich nur geringfügig voneinander (BAILLIE, FERGUSON und HART 1966; BALOGH et al. 1966; BARKA und ANDERSON 1963; BARKA und DALLNER 1958; BERGMANN, BJERSING und NILSSON 1966; BURSTONE 1962; DARIUSH und KARNOVSKY 1966; DAVIES et al. 1966; DEANE und MARX 1963; ROSENBAUM 1964; GRIFFITHS und GLICK 1966; HART 1966; PEARSE 1961; PEARSE, SCARPELLI und HESS 1960; REISS 1967; SCHREIBER und SIMON 1963; STILLER und GORSKI 1966; WATTENBERG 1958). Eine elektronenmikroskopische Darstellung von Dehydrogenasen im allgemeinen und der 3ß-HSD im besonderen ist dagegen erst in den letzten Jahren gelungen und nur von wenigen Untersuchern an adulten Individuen erprobt worden (BARRNETT, KARMARKAR und SELIGMANN 1959; BRADBURY und STEWARD 1964; NACHLAS, TSOU,

DE SOUZA, CHENG und SELIGMAN 1957; PEARSE 1961; SEDAR und ROSA 1961; SELIGMAN, UENO, MORIZONO, WASSERKRUG, KATZOFF und HANKER 1966; YATES 1965).

Das Prinzip des Nachweises besteht beim licht- und beim elektronenmikroskopischen Nachweis darin, den vom Substrat stammenden Wasserstoff auf einen geeigneten Acceptor zu übertragen.



Schematische Darstellung des Ablaufes des 3ß-HSD-Nachweises (nach BAILLIE, FERGUSON, McK HART 1966)

Als Wasserstoffacceptor werden Tetrazoliumsalze verwendet, die in oxydiertem Zustand farblos und in reduziertem gefärbt sind. Im Laufe der Zeit sind verschiedene Tetrazoliumsalze eigens für histochemische Zwecke synthetisiert und angewandt worden, die gegenüber dem ursprünglichen Neotetrazoliumchlorid beträchtliche Vorteile aufweisen (BJARNE 1958; ROSENBAUM 1964; PEARSE und SCARPELLI 1960; ROSA und TSOU 1963; SELIGMAN, UENO, MORIZONO, WASSERKRUG, KATZOFF und HANKER 1966). Diese Vorteile betreffen die stärkere Farbintensität, die geringere Kristallgröße des Formazans oder amorphe Ausfällung, die leichtere Reduzierbarkeit und - bei Ditetrazoliumsalzen wie Nitro-BT,

Tetranitro-BT und TC-NBT- eine weitgehende Lipidunlöslichkeit der Formazane (NACHLAS, TSOU, DE SOUZA, CHENG und SELIGMAN 1957; ROSA und TSOU 1963; SELIGMAN, UENO, MORIZONO, WASSERKRUG, KATZOFF und HANKER 1966). Die Lipidunlöslichkeit erlaubt eine Entwässerung der Präparate und daher den für die mikroskopische Betrachtung vorteilhaften Einschluß in ein wasserfreies Medium. Da die gängigen Einbettungsmittel der Elektronenmikroskopie praktische alle aggressive Lipidlösungsmittel sind, müssen beim elektronenmikroskopischen Nachweis lipidunlösliche Formazane verwendet werden. Dazu kommt noch die Forderung nach Osmiophilie, um einen hohen Kontrast im Elektronenmikroskop zu erzielen. (MEIER-RUGE 1965; NACHLAS, TSOU, DE SOUZA, CHENG und SELIGMAN 1957; ROSA und TSOU 1963; SEDAR und ROSA 1961; SELIGMAN, UENO, MORIZONO, WASSERKRUG, KATZOFF und HANKER 1966). Mit Nitro-BT, Tetranitro-BT und TC-NBT stehen solche Tetrazole zur Verfügung, doch erfüllen sie nicht alle diese Voraussetzungen in befriedigendem Maße. Die Osmiophilie und damit der Kontrast im elektronenoptischen Bild steigt von Nitro-BT über Tetra-NBT zu TC-NBT an und die Formazane sind genügend mikrokristallin. Ein bis jetzt noch bei allen Formazanen ungelöstes Problem ist aber die Löslichkeit in organischen Solventien. Entgegen den Angaben aus der Literatur waren bei den eigenen Versuchen die Formazane der drei Tetrazole in einem Umfange lipidlöslich, der eine Entwässerung über Aethanol und DePeX-Einschluß nicht zuließ. Zudem schwankte die Lipidlöslichkeit eines Formazans bei ein und derselben Firma von Charge zu Charge erheblich. Speziell für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde als besonders osmiophiles Tetrazoliumsalz das TC-NBT entwickelt (SELIGMAN, UENO, MORIZONO, WASSERKRUG, KATZOFF und HANKER 1966). Für die Lichtmikroskopie war es gegen die Nachfixierung im Anschluß an die Inkubation zu empfindlich. Unter dem Einfluß der Nachfixierung (Formol) kam es zur Reduktion des noch im Gewebe befindlichen TC-NBT mit diffusen Formazanniederschlägen, ein Effekt, der auch durch gründliches Auswaschen der Inkubationslösung nicht völlig verhindert werden konnte. Aus diesem Grund wurde für lichtmikroskopische Untersuchungen das gegen Formolreste weniger empfindliche Nitro-BT vorgezogen.

Abweichend vom Vorgehen beim lichtmikroskopischen Enzymnachweis können für die Elektronenmikroskopie keine nativen Kryostatschnitte verwendet werden, da bei ihnen die Strukturerhaltung nicht befriedigend ist. Eine aus diesem Grund erforderliche chemische Fixierung vor der Inkubation führt unvermeidlich zu einer Aktivitätsabnahme des Enzyms infolge der mit der Fixierung einhergehenden

Protein-Denaturierung. Das Ausmaß der Denaturierung ist bei den einzelnen Fixierungsmitteln unterschiedlich und daher auch das Ausmaß der durch sie innerhalb ihrer Einwirkungszeit hervorgerufenen Hemmung der Enzymaktivität. Es galt, für die vorliegende Untersuchung ein Fixierungsmittel zu finden, welches die 3ß-HSD erst nach langer Fixierungszeit hemmt und dabei doch zu einer guten Zellerhaltung führt. Bei zu langer Einwirkung zerstört jede Fixierung jede Enzymaktivität, was auch hier nachgewiesen werden konnte.

Für elektronenmikroskopisch-histochemische Untersuchungen sind zur Vorfixierung einige Aldehyde im Gebrauch (SABATINI und BARRNETT, 1963), welche die Aktivität verschiedener Enzyme unterschiedlich stark beeinflussen und welche unterschiedlich gute Zellerhaltung ermöglichen. Da Dehydrogenasen sich gegenüber einer Fixierung als besonders empfindlich erwiesen haben, unterbinden die meisten dieser Aldehyde die Aktivität verschiedener Dehydrogenasen selbst bei kürzester Einwirkungszeit völlig, so Formaldehyd, Crotonaldehyd und Glutardialdehyd. Bei Formaldehyd werden aber auch gegensätzliche Ergebnisse berichtet (WALKER und SELIGMAN, 1961; WOHLRAB und COSSEL, 1964). In Vorversuchen hat sich für den Nachweis von Dehydrogenasen der auch von anderen Autoren (BRADBURY und STEWARD 1964) angegebene Hydroxydipinaldehyd als am geeignetsten erwiesen.

Eine Voraussetzung für den Ablauf der Nachweisreaktion ist, daß die Nachweisreagentien in ausreichender Konzentration an die Stelle des Enzymvorkommens gelangen. Die geringe Eindringtiefe der Inkubationslösung oder ihrer einzelnen Komponenten in das Gewebe beim Dehydrogenase-Nachweis ist bekannt (CASCARANO und ZWEIFACH 1959; WOHLRAB und COSSEL 1964). Sie beträgt nach eigenen Beobachtungen bei Nitro-BT und TC-NBT 70-10 µm, was bei der Untersuchung der Nebenniere, die (mindestens bis zum 6.postnatalen Tag) aus technischen Gründen in toto inkubiert werden mußte, nicht immer ausreicht, um die ganze Rinde zu erfassen. Damit ist aber die Möglichkeit gegeben, daß ein negativer Reaktionsausfall nicht der Hinweis auf ein fehlendes Enzym-

vorkommen ist, sondern aus dem geringen Diffusionsvermögen der Reagenslösung zu erklären ist. Besonders bei der Verfolgung von Funktionsentwicklungen, in deren Verlauf in jedem Fall zunächst minimale Enzymmengen auftreten, ist diese technische Fehlermöglichkeit von großer Bedeutung. Zusammen mit dem unkontrollierbaren Löslichkeitsverhalten der im Reaktionsverlauf gebildeten Formazane lassen sie den Einsatz eines elektronenmikroskopisch-histochemischen Verfahrens zum 3ß-HSD-Nachweis wenig sinnvoll erscheinen. Aus diesem Grund wurde die Funktionsentwicklung vorwiegend anhand lichtmikroskopisch-histochemischer und elektronenmikroskopisch-morphologischer Befunde verfolgt.

Beim lichtmikroskopisch-histochemischen 3ß-HSD-Nachweis ist hauptsächlich eine Fehlerquelle vorhanden, die allerdings gerade bei geringer Aktivitätshöhe coenzymabhängiger Dehydrogenasen die Beurteilung einer spezifischen Enzymaktivität erschweren oder unmöglich machen kann, nämlich die "unspezifischen Dehydrogenasen"("Nothing-Dehydrogenase") (PEARSE 1961; REISS 1967; SHAW und KOEN 1965; ZIMMERMANN und PEARSE 1959). Ihre zuverlässige Hemmung mußte Vorbedingung für die Untersuchung sein, da sich die Spezifität der Reaktion bei jungen Stadien nicht wie bei der relativ hoch aktiven 3ß-HSD in der erwachsenen Nebennierenrinde aus dem Intensitätsunterschied und der Verteilung ablesen läßt. Die "unspezifische Dehydrogenase" ist im erwachsenen Nebennierenmark stärker positiv als in der Rinde. Die Hemmung konnte mit einem Maleinimidzusatz (ZIMMERMANN und PEARSE, 1959) zur Inkubationslösung zuverlässig erzielt werden, ohne daß die 3ß-HSD-Aktivität sichtbar gemindert wurde.

Die kombinierte lichtmikroskopisch-histochemische und elektronenmikroskopisch-morphologische Untersuchung der Funktionsentwicklung der Nebennierenrinde hat folgende Befunde gebracht:

Es besteht kein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Enzymaktivität und der für die adulte Nebennierenrinde spezifischen tubulären Mitochondrienstruktur. Eine Aktivität der 3ß-HSD ist erstmals 2 Tage vor der Geburt nachzuweisen und nimmt von da an bis zur Geburt rasch,

dann nur noch langsam zu und erreicht am 9. postnatalen Tag die gleiche Intensität wie in der erwachsenen Nebennierenrinde (Abb. 2 bis 11). Dabei erwerben allerdings nicht alle Zellen der Rinde gleichzeitig die 3ß-HSD-Aktivität. Im Stadium -2 Tage findet sie sich vielmehr nur bei etwas mehr als der Hälfte der Rindenzellen und erst beim Neugeborenen ist sie in allen Rindenzellen nachweisbar. Die geringere Reaktionsintensität in den äußeren Rindenpartien zwischen dem 3. und dem 13. postnatalen Tag kann als Ausdruck einer verminderten Enzymaktivität gewertet werden mit einer entsprechenden niedrigeren Steroidsyntheseleistung. Denn wie aus der Stellung der 3ß-HSD in der Corticosteroidbiosynthese hervorgeht, läßt eine Aktivitätsänderung dieses Enzyms keine Schlüsse auf eine qualitative Änderung in der Steroidsynthese der Nebennierenrinde zu. Die mit der Ausbildung der kleinzelligen Zone zwischen Zona glomerulosa und Zona fasciculata und der fortschreitenden Ausbildung der Rindenstruktur, vor allem der Zona glomerulosa einhergehende Abnahme und anschließende Zunahme der Enzymaktivität in diesen Zonen, spricht dafür, daß während der Zellproliferation eine generell verminderte inkretorische Aktivität in den betroffenen Zellen vorliegt (BACHMANN, 1954). Mit Ausbildung der definitiven Rindenstruktur tritt auch die gleichmäßige Aktivitätsverteilung der 3ß-HSD im ganzen Rindenbereich auf, die für das Erwachsenenstadium typisch ist (BAILLIE, FERGUSON und HART, 1966). Ebenso wie die Zona glomerulosa zeigt die kleinzellige Zone in jenem Entwicklungsabschnitt eine deutlich geringere Enzymaktivität als die angrenzende Zona fasciculata. Es ist naheliegend, sie als die Keimschicht vor allem für die zu dieser Zeit stark an Umfang zunehmende Zona glomerulosa anzusehen (BACHMANN, 1954). Ob aus dieser Schicht die Zellen der Zona fasciculata hervorgehen, ist mit Hilfe der angewandten Versuchsanordnung nicht nachzuprüfen: Es ist

möglich, daß diese kleinzellige Zone dem von manchen Autoren angegebenen "äußeren Transformationsfeld" entspricht (BACHMANN, 1954). Für ein "inneres Transformationsfeld" zwischen Zona fasciculata und Zona reticularis konnte kein Anhalt gefunden werden. Das Fehlen einer nachweisbaren "Keimschicht" zwischen Zona fasciculata und Zona reticularis läßt die Vermutung zu, die Zona reticularis entstehe direkt aus den Zellen der Zona fasciculata. Ob das nur durch Auseinanderweichen ehemaliger Fasciculatazellen oder durch markwärts gerichtete Proliferation der Fasciculatazellen oder auf andere Weise geschieht, kann aus den bei dieser Untersuchung erhobenen Befunden nicht beantwortet werden, ebensowenig wie die Frage, ob die Zona reticularis durch Degenerationsvorgänge aus der Zona fasciculata entstehe (BACHMANN, 1954). Elektronenmikroskopisch ergeben sich für die Zellen von Zona reticularis und Zona fasciculata weniger differierende Merkmale als zwischen Zona fasciculata und Zona glomerulosa (PROBST und MÜLLER, 1966; SABATINI und DE ROBERTIS, 1961).Die Annahme, die Zona reticularis entstehe aus der inneren Zona fasciculata, erscheint von dieser Sicht aus nicht abwegig.

Die Struktur der Mitochondrien ist nicht erkennbar mit der HSD-Aktivität gekoppelt. Die 3ß-HSD ist bereits in der ganzen Rinde deutlich aktiv, wenn im Stadium -1 (Abb. 14) noch keine Tubulus-Mitochondrien nachgewiesen werden können. Auch beim erwachsenen Tier scheint die 3ß-HSD-Aktivität nicht streng an den Tubulus-Typ gebunden zu sein, denn es wurden in der äußeren Zona glomerulosa Mitochondrien mit leitersprossenartigen Cristae gefunden, die eine deutlich positive 3ß-HSD-Reaktion zeigten. Desgleichen hat wohl das Persistieren der Crista-Mitochondrien in der Rindenaußenzone keinen Bezug zu der Aktivitätsänderung in diesem Areal vom 5. bis zum 13. postnatalen

Tag, da die Enzymaktivität ohne deutliche Änderung der Mitochondrienstruktur in dieser Zone ab- und vom 13. bis zum 16. Tag wieder zunimmt. Auch die Beobachtung "pseudokristalliner" Mitochondrien (PROBST und MÜLLER, 1966) vom 8. bis zum 16. Tag, wie sie beim erwachsenen Tier in dieser Zone vorkommen, fällt zeitlich nicht mit dem Verhalten der Enzymaktivität zusammen. Möglich wäre aber, daß die Strukturunterschiede der Mitochondrien nicht qualitativ sondern quantitativ mit der Enzymaktivität zusammenhängen, in dem Sinne, daß oberhalb einer bestimmten inkretorischen Aktivität der leistungsfähigere (?) Tubulus-Typ dominiert. Umbauvorgänge vom Crista- zum Tublus-Typ sind bei ACTH-Gabe beobachtet worden (YATES, 1965). Hier verschwand der Crista-Anteil in den dünnen Abschnitten der Fasciculata-Mitochondrien und wurde durch Tubuli ersetzt. Gleichzeitig rundeten sich die Mitochondrien ab und wurden etwas größer. Damit würde auch übereinstimmen, daß in den während der Umbauvorgänge zur erwachsenen Nebennierenrinde dauernd und am stärksten enzymatisch aktiven Mittel- und Innenzonen bereits am ersten und am zweiten postnatalen Tag Tubulus-Mitochondrien wie beim erwachsenen Tier ausgebildet sind und bestehen bleiben. Mit dem Auftreten "pseudokristalliner" Mitochondrien in der Außenzone der Rinde am 8. postnatalen Tag fallen auch hier die letzten Unterschiede zur Zona glomerulosa des erwachsenen Hamsters weg. Es ist also die definitive Struktur der Mitochondrien der Nebennierenrinde bereits lange vor der Ausbildung der endgültigen lichtmikroskopischen Rindenstruktur, im wesentlichen schon beim neugeborenen Hamster ausgebildet. Das bedeutet, daß die Zellen eines Organs ihre endgültige Ultrastruktur vor der Ausreifung des gesamten Organs entwickeln können. Noch früher, d.h. vor Ausbildung der definitiven Ultrastruktur der Zellen kann die spezifische Funktion der Zellen einsetzen. Zur vollen funktionellen Reife des Organs sind aber doch die definitiven Zell- und

Organstrukturen nötig, wie die Zunahme der Enzymaktivität im Lauf der Entwicklung zeigt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivitätsentwicklung der d5-3ß-HSD wurde an Nebennieren von Goldhamsterembryonen und Jungtieren der Stadien -3, -2, -1 Tage vor der Geburt bzw. +1 bis +6, +9, +13,+16 Tage nach der Geburt untersucht und mit der Entwicklung der Mitochondrienstruktur verglichen. Das Enzym tritt im Stadium -2 Tage erstmalig auf und erreicht im Stadium +9 Tage die Intensität des Erwachsenenstadiums. Die Ausbildung der definitiven Rindenstruktur ist am 16. postnatalen Tag beendet. Der Umbau von Crista- zu Tubulus-Mitochondrien in den mittleren und inneren Rindenzonen erfolgt 2 Tage nach dem Auftreten der Enzymaktivität. In den Rindenaußenzonen bleiben Crista-Mitochondrien bis ins Erwachsenenalter erhalten. Die Ultrastruktur der Nebennierenrindenzellen hat bereits am 1. postnatalen Tag die Verhältnisse wie bei der Nebennierenrinde des erwachsenen Tieres im wesentlichen erreicht. Ein qualitativer Einfluß der Mitochondrienstruktur auf die Enzymaktivität konnte nicht nachgewiesen werden, ein quantitativer wird diskutiert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ARNOLD, M.:

Histochemie der Differenzierungsvorgänge: Grundfragen zum Thema (methodische Fragen).

Podiumsdiskussion und Symposion der Gesellschaft für Histochemie München, 1966

ARNOLD, M.:

Die Abhängigkeit der Datierung von Differenzierungsstufen von der quantitativen Erfassungsgrenze.

Symposion Histochemistry of Morphogenesis, Amsterdam, 1968

ARNOLD, M. und G. HAGER:

Funktionsentwicklung der Nebenniere beim Goldhamster. Elektronenmikroskopische Untersuchung am Mark.

Z. Zellforsch. 83, 117-132, 1967

BACHMANN, R.:

Die Nebenniere.

In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen VI/5. Hrsg.: BARGMANN, W. und W.v. MÖLLENDORF. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer, 1954

BAILLIE, M. H., M.M. FERGUSON and D. McK. HART:

Developments in steroid histochemistry.

London-New York, Academic Press, 1966

BALOGH jr., K.:

Histochemical demonstration of 3a-hydroxysteroid-dehydrogenase activity.

J. Histochem. Cytochem. 14, 77-83. 1966

BALOGH jr., K., W.R. KIDWELL and W.G. WIEST:

Histochemical localization of rat ovarian 20a-hydroxy-steroid-dehydrogenase activity initiated by gonadotropic hormone administration.

Endocrinolgy 78, 75-81, 1966

BARKA, T. and P.J. ANDERSON:

Histochemistry, theory, practice and bibliography

New York, Harper and Row, 1963

BARKA, T. and G. DALLNER:

The reduction of tetrazolium salts by ascites tumor cells in the presence of glucose

J. Histochem. Cytochem. 6, 174-180, 1958

BARRNETT, R.J., S.S. KARMARKAR and A.M. SELIGMAN:

The use of ditetrazoliumsalts as reagents for the demonstration of the sites of dehydrogenase activity with the electron microscope.

J. Histochem. Cytochem. 7, 300- 301, 1959

BERGMAN, S., L. BJERSING and O. NILSSON:

Histochemical demonstration of d5-3ß-dehydrogenase activity in cultivated granulosa cells of the porcine ovary.

Acta Path. Microbiol. Scand. 68, 461-462, 1966

BJARNE, P.:

Improvements in the histochemical localization of succinic-dehydrogenase by use of nitroneotetrazolium chloride.

J. Histochem. Cytochem. 6, 112-121, 1958

BRADBURY, S. and V.W. STEWARD:

A note on the electron staining of diformazan deposits in tissue sections.

J. roy.micr. Soc. 83, 467-470, 1964

BURSTONE, M. S.:

Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms.

London-New York, Academic Press, 1962

CASCARANO, J. and B.W. ZWEIFACH:

Metabolic and physical factors influencing the penetration of tetrazolium salts.

J. biophys. biochem. Cytol. 6, 215-220, 1959

DARIUSH, F.H. and M.J. KARNOVSKY:

Cytochemical localization of two glycolytic dehydrogenases in white skeletal muscle.

J. Cell Biol. 29, 113-127, 1966

DAVIES, J., G.R. DAVENPORT, J.L. NORRIS and P.I.C. RENNIE:

Histochemical studies of hydroxysteroid-dehydrogenase activity in mammalian reproductive tissues.

Endocrinology 78, 667-671, 1966

DEANE, H.W. and A.J. MARX:

Histophysiologic changes in the kidney and adrenal cortex in rats on a low sodium diet.

Endocrinology 73, 317-328, 1963

GRIFFITHS, K. and D. GLICK:

Determination of the 11ß-hydroxylase activity in microgram samples of tissue; quantitative distribution in the rat adrenal and the influence of corticotropin.

J. Endocr. 35, 1-12, 1966

HART, D. McK.:

The histochemical distribution of hydroxysteroid-dehydrogenase in the human foetal membranes at term.

Histochemie 6, 17-23, 1966

HART, D. McK., A.H. BAILLIE, K.C. CALMAN and M.M. FERGUSON:

Hydroxysteroid-dehydrogenase development in mouse adrenal and gonads.

J. Anat. (Lond.) 100, 801-812, 1966

KARNOVSKY, M.J.:

Simple methods for "staining with lead" at high p_H in electron microscopy.

J. biophys. biochem. Cytol. 11, 729-732, 1961

KELLENBERGER, W., W. SCHWAB et A. RYTER:

L'utilisation d'un copolymère du groupe des polyesters comme matériel d'inclusion en ultramicrotomie.

Experientia (Basel) 12, 421-422, 1956

MEIER-RUGE, W.:

Vergleichende Untersuchungen über die histotopochemischen Qualitäten der Tetrazolsalze MTT, Nitro-BT und TNBT in der Enzymhistochemie.

Histochemie 4, 438-445, 1965

NACHLAS, M.M., K.C. TSOU, E. DE SOUZA, C.S. CHENG and A.M. SELIGMAN:

Cytochemical demonstration of succinic-dehydrogenase by use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole.

J. Histochem. Cytochem. 5, 420-436, 1957

NOVIKOFF, A.B.:

Enzyme cytochemistry: pitfalls in the current use of tetrazolium techniques.

J.Histochem. Cytochem. 7, 301-302, 1959

OGAWA, K. and R.J. BARRNETT:

Electron cytochemical studies of succinic dehydrogenase and dihydronicotinamide-adenine dinucleotide-diaphorase activities.

J. Ultrastruct. Res. 12, 488-508, 1965

PALADE, G.E.:

A study of fixation for electron microscopy.

J. exp. Med. 95, 285-298, 1952

PEARSE, A.G.E.:

Histochemistry, theoretical and applied. 2nd Ed.

London, J. and A. Churchill, 1961

PEARSE, A.G.E., D.G. SCARPELLI and R. HESS:

A cytochenical study of the dehydrogenase of mitochondria and mitochondrial particulates by a monotetrazolium-cobalt chelation method.

J. biophys. biochem. Cytol. 7, 243-249, 1960

PROBST, A. und O. MÜLLER:

Die Zonen der Nebennierenrinde der Ratte.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen.

Z. Zellforsch. 75, 404-421, 1966

REISS, J.:

Grundlagen und neuere Ergebnisse des histochemischen Nachweises von Dehydrogenasen mit Tetrazoliumsalzen.

Z. wiss. Mikr. 68, 169-189, 1967

ROMEIS, B.:

Mikroskopische Technik. 16. Aufl.

Wien- München, R. Oldenbourg, 1968

ROSA, C.G. and K.C. TSOU:

The use of tetranitro-blue-tetrazolium for the cytochemical localization of succinic-dehydrogenase.

J. Cell Biol. 16, 445-454, 1963

ROSENBAUM, R.M.:

In: Handbuch der Histochemie VII/4.
Hrsg.: GRAUMANN, W. und K. NEUMANN.

Stuttgart, G. Fischer, 1964

SABATINI, D.D., K. BENSCH,and R.J. BARRNETT:

The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation.

J. Cell Biol. 17, 19-58, 1963

SABATINI, D.D. and E.D.P. DE ROBERTIS:

Ultrastructural zonation of adrenocortex in the rat.

J. biophys. biochem. Cytol. 9, 105-119, 1961

SCHREIBER, G. und H. SIMON:

Beitrag zur Technik des histotopochemischen Dehydrogenasennachweises.

Acta histochem. (Jena) 15, 192-193, 1963

SEDAR, A.W. and C.G. ROSA:

Cytochemical demonstration of the succinic-dehydrogenase system with the electron microscope using nitro-blue-tetrazolium.

J. Ultrastruct. Res. 5, 226-245. 1961

SELIGMAN, A.M., H. UENO, Y. MORIZONO, H.L. WASSERKRUG, L. KATZOFF and J. S. HANKER:

Electron microscopic demonstration of dehydrogenase activity with a new osmiophilic ditetrazolium salt (TC-NBT).

J. Histochem. Cytochem. 15, 1-13, 1966

SHAW, Ch.R. and A.L. KOEN:

On the identity of "nothing dehydrogenase".

J.Histochem. Cytochem. 13, 431-433, 1965

STILLER, D. und J. GORSKI:

Untersuchungen zur histochemischen Darstellung der Sorbitdehydrogenase.

Histochemie 6, 156-163, 1966

WALKER, D.G. and A.M. SELIGMAN:

Formalin fixation in the cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase in mitochondria.

J. biophys. biochem. Cytol. 9, 415-427, 1961

WATTENBERG, L.W.:

Microscopic histochemical demonstration of steroid-3ß-ol-dehydrogenase in tissue sections.

J. Histochem. Cytochem. 6, 225-232, 1958

WOHLRAB, F. und L. COSSEL:

Zur Problematik des elektronenmikroskopischen Nachweises von Dehydrogenasen in der Zelle.

Z. mikr.-anat. Forsch. 71, 457-477, 1964

YATES, R.D.:

Fine structural observations on untreated and ACTH-treated adrenocortical cells of the zona reticularis of syrian hamsters.

Z. Zellforsch. 66, 384-395, 1965

ZIMMERMANN, H. and A.G.E. PEARSE:

Limitations in the histological demonstration of pyridine nucleotide linked dehydrogenases ("nothing dehydrogenase").

J. Histochem. Cytochem. 7, 271-275, 1959

A B B I L D U N G S L E G E N D E N

Abb. 1: Stadium -3 Tage. 3ß-HSD-Nachweis: keine Formazanablagerung in der Rinde, undeutliche Rinden-Mark-Grenze (Pfeile).
400:1

Abb. 2: Stadium -2 Tage. 3ß-HSD-Nachweis: Formazangranula in einzelnen Rindenzellen.
520:1

Abb. 3: Stadium -1 Tag. 3ß-HSD-Nachweis: in fast allen Rindenzellen Formazanablagerungen. Rinden-Mark-Grenze durch Pfeile markiert.
520:1

Abb. 4: Stadium +1 Tag. 3ß-HSD-Nachweis: starke Formazanablagerung in der ganzen Rinde. Kapsel und Rinden-Mark-Grenze durch Pfeile markiert.
520:1

Abb. 5: Stadium +1 Tag. 3ß-HSD-Nachweis, Kontrolle: formazanfreie Nebennierenrinde.
400:1

Abb. 6: Stadium +6 Tage. 3ß-HSD-Nachweis: stärkere Enzymaktivität in der Zona fasciculata und Zona reticularis als in der Rindenaußenzone.
520:1

Abb. 7: Stadium +9 Tage. Kleinzellige Zone zwischen Zona fasciculata und Zona glomerulosa (Pfeile). Hämalaun/Erythrosin.
520:1

Abb. 8: Stadium +13 Tage. 3ß-HSD-Nachweis: geringere Enzymaktivität in der Zona glomerulosa als in den übrigen Zonen.
520:1

Abb. 9: Stadium +16 Tage. 3ß-HSD-Nachweis: gleichmäßig verteilte Formazanablagerung in der ganzen Rinde.
520:1

Abb. 10: Stadium +16 Tage. Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis deutlich unterscheidbar (Pfeile) Hämalaun Erythrosin.
400:1

Abb. 11: Erwachsener Hamster. 3ß-HSD-Nachweis: gleichmäßig verteilte Formazanablagerung in der ganzen Rinde.
320:1

Abb. 12: Erwachsener Hamster. Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis (Pfeile) erkennbar. Hämalaun/Erythrosin.
250:1

Abb. 13: Stadium -3 Tage. Mitochondrien einer Zelle aus der Rindenmitte. Ovale Mitochondrien mit leitersprossenartig angeordneten Cristae (Pfeil).
28 000:1

Abb. 14: Stadium -1 Tag. Zelle aus dem äußeren Rindenbereich mit ovalen Mitochondrien und leitersprossenartigen Cristae, weite Zwischenräume der Cristae (Pfeil).
28 000:1

Abb. 15: Stadium +1 Tag. Mittlere Rindenzone (Zona fasciculata), runde, hufeisenförmig gebogene und zyklische Mitochondrien mit Tubulusstruktur (Pfeile).
25 000:1

Abb. 16: Stadium +2 Tage. Crista-Mitochondrien in der Rindenaußenzone (Zona glomerulosa).
25 000:1

Abb. 17: Stadium +8 Tage. Parallel angeordnete gerade verlaufende oder halbkreisförmig gebogene Cristae mitochondriales in der Zona glomerulosa (Pfeil).
28 000:1

Abb. 18: Mitochondrien mit regelmäßig angeordneten Cristae in der Zona glomerulosa des erwachsenen Hamsters (Pfeil). Daneben Tubuli und reine Tubulus-Mitochondrien.
28 000:1

Abb. 19: Mitochondrien mit Tubulusstruktur in der Zona fasciculata des erwachsenen Hamsters. In den schmalen Mitochondrienteilen längsverlaufende, parallele Cristae. (Pfeil).
25 000:1

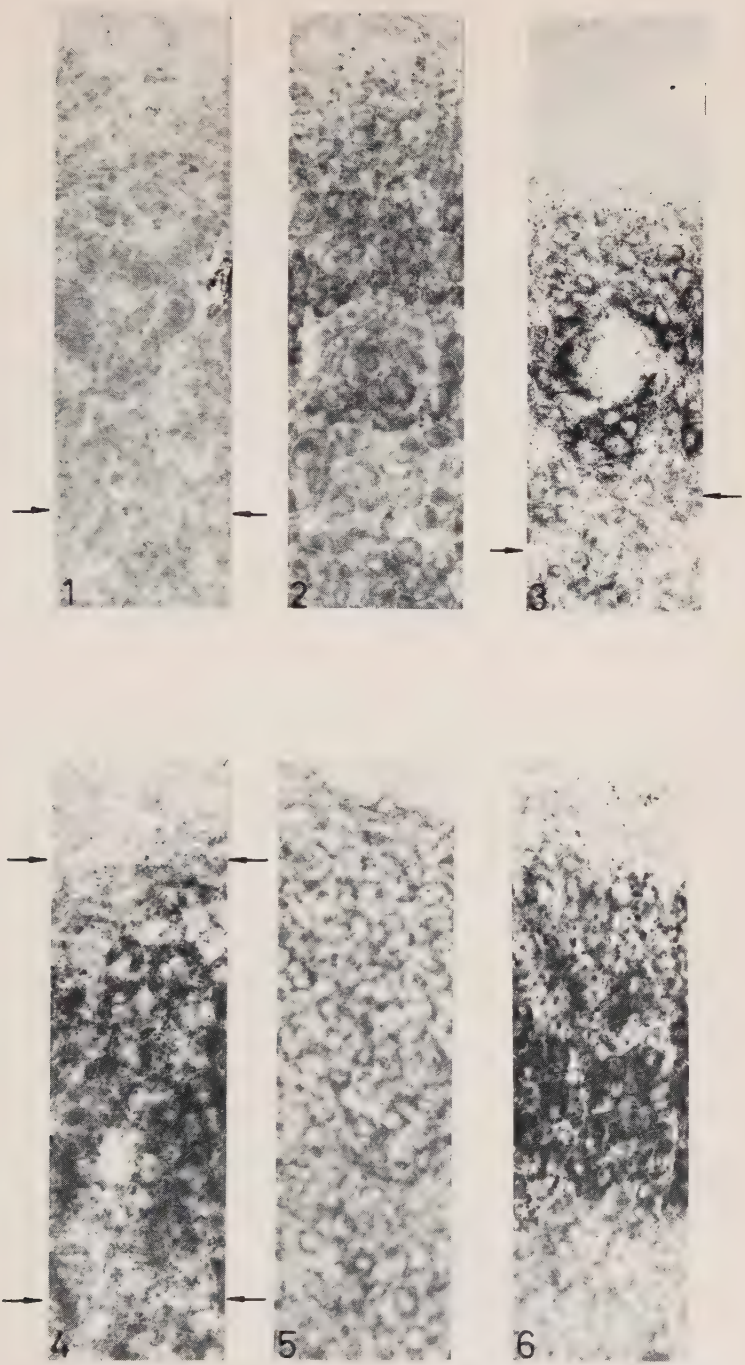
Abb. 20: Erwachsener Hamster. Zona glomerulosa, 3ß-HSD-Nachweis, Kontrolle: Mitochondrien nicht stär-

ker geschwärzt als die anderen Zellstrukturen.
25 000:1

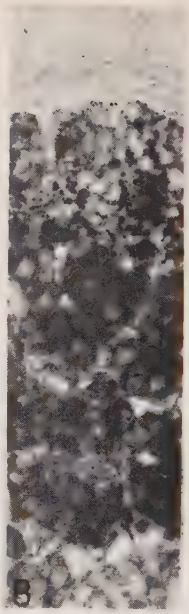
Abb. 21: Stadium +1 Tag. 3ß-HSD-Nachweis: gegenüber anderen Zellbestandteilen deutlich stärker geschwärzte Mitochondrien vom Tubulus-Typ. Schwärzung der einzelnen Mitochondrien unterschiedlich stark. Zwei nicht geschwärzte Mitochondrien vom Crista-Typ (Pfeil).
21 000:1

Abb. 22: Stadium +1 Tag. 3ß-HSD-Nachweis: 3ß-HSD-reaktive Mitochondrien vom Crista-Typ in der Rindenaußenzone.
25 000:1

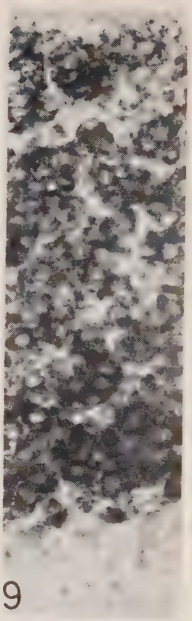
Abb. 23: Stadium -1 Tag. 3ß-HSD-Nachweis: 3ß-HSD- reaktive Mitochondrien vom Crista-Typ mit vereinzelten Tubuli. Schwärzung der einzelnen Mitochondrien unterschiedlich, ein nicht reaktives Mitochondrion vom Crista-Typ (Pfeil).
28 000:1


1
2
3
4
5
6

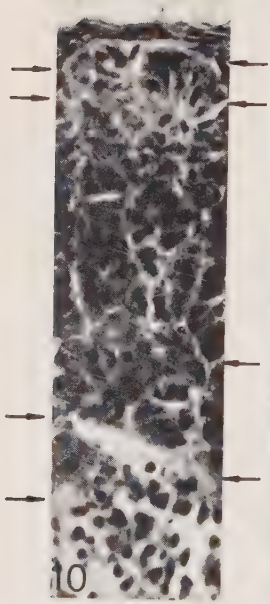
7



8



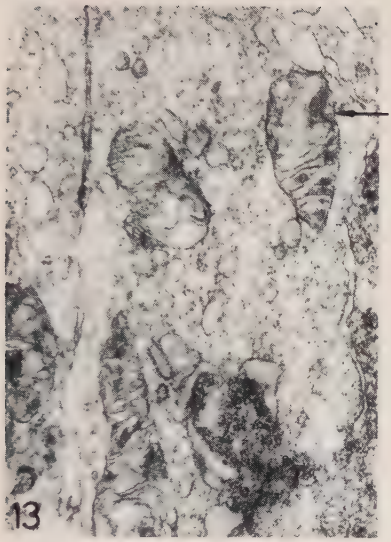
9

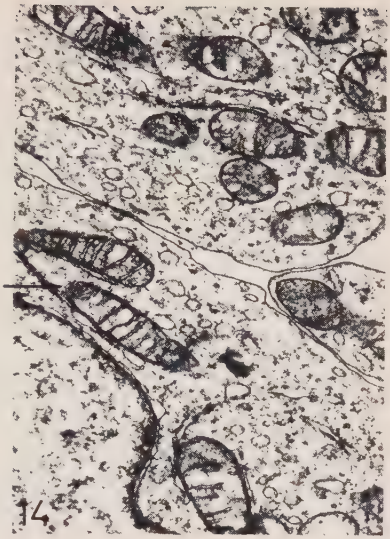


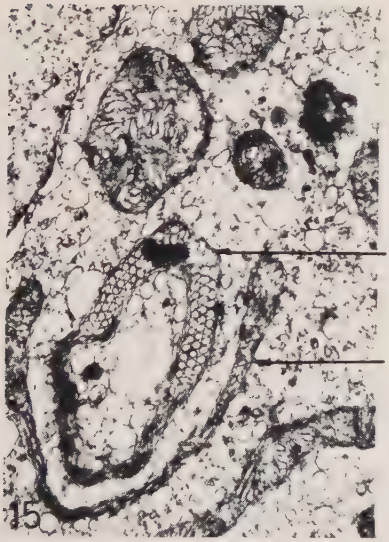
10

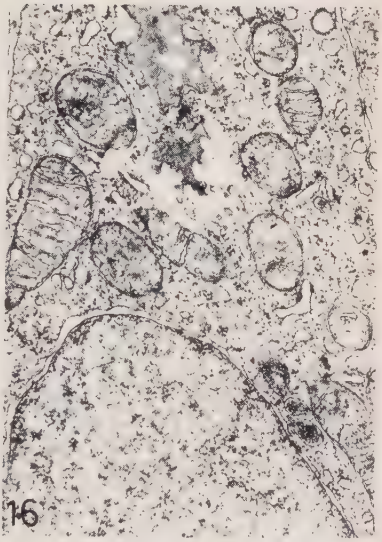
11

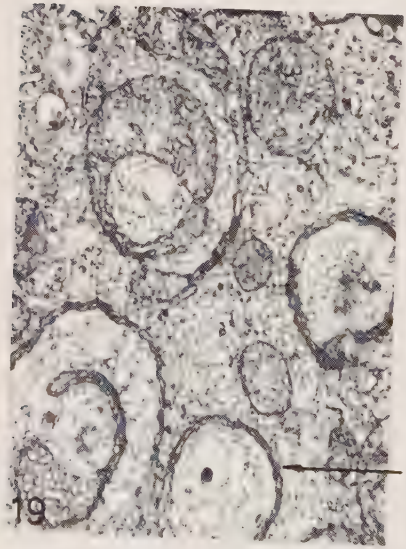
12

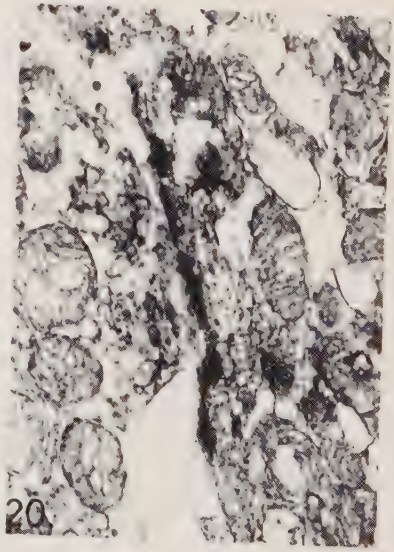

13

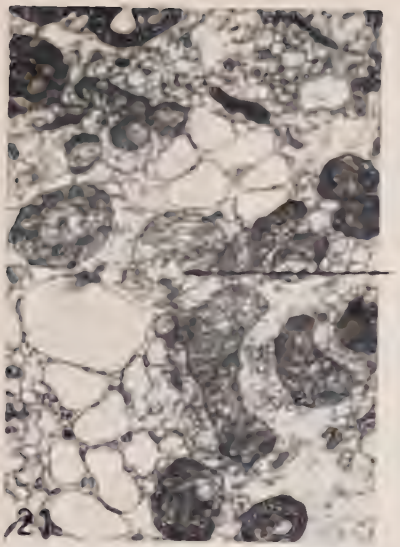

14

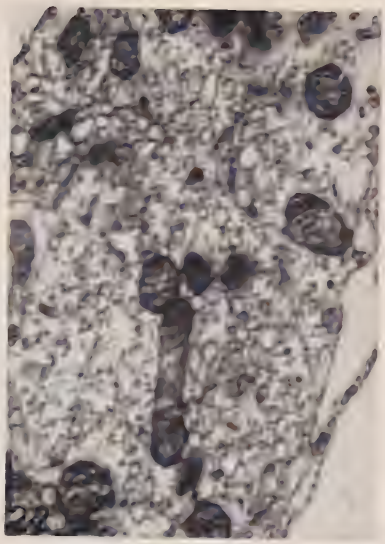

15


16






21


22

23

Am Schluß der Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. med. Graumann für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Anatomischen Institut der Universität Tübingen und Herrn Dozent Dr. med. Arnold für die Anregung zu dieser Arbeit und seine Anleitungen bei der Durchführung der Versuche herzlich danken.

L E B E N S L A U F

Am 22. Mai 1945 wurde ich, Hans Joachim Becker, als Sohn des Arztes Dr. med. Friedrich Reinhard Becker und seiner Ehefrau Elsbeth Frida Becker geb. Haier zu Schönaich geboren.

Nach vier Klassen Grundschule in Böblingen besuchte ich das Goldberg-Gymnasium in Sindelfingen, wo ich am 24. Februar 1964 das Zeugnis der Reife erhielt.

Im Sommersemester 1964 nahm ich das Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen auf. Im April 1965 legte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, im September 1966 die Ärztliche Vorprüfung und im Februar 1970 die Ärztliche Prüfung in Tübingen ab.

Im Frühjahr 1967 nahm ich von Doz. Dr. med. M. Arnold das Thema der vorliegenden Dissertation an und führte sie bis zum Frühjahr 1969 am Anatomischen Institut der Universität Tübingen zu Ende.

Tübingen, Februar 1970